

200400672A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 門田 守人

平成17（2005）年4月

# 目次

## I. 総合研究報告書

- C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究 ————— 1  
門田 守人

## II. 分担研究報告

1. C型肝炎への肝移植後の免疫療法に関する研究 ————— 7  
浅原利正
2. 遺伝子解析を用いた肝移植後の再発性C型肝炎に対する治療効果予測の試み ——— 12  
市田隆文
3. C型肝炎への肝移植後の免疫療法に関する研究  
—免疫抑制剤早期転換による予防的抗ウイルス療法の導入— ————— 15  
兼松隆之
4. C型肝炎に対する肝移植後の管理:免疫抑制と肝炎対策に関する研究 ————— 18  
北島政樹
5. —わが国のC型肝炎移植後の抗ウイルス療法の実態とC型慢性肝炎に対する  
インターフェロンとリバビリン併用療法の実態— ————— 20  
清澤研道
6. C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究  
—東北大学病院における経験— ————— 23  
里見進
7. C型肝炎への生体肝移植後の肝炎再発に関する研究 ————— 28  
田中絃一

8. C型肝炎への肝移植における抗ウイルス療法に関する研究	32
田中紀章	
9. C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究	35
寺岡慧	
10. C型肝炎肝硬変生体肝移植、ステロイドフリーレジメにおける肝炎再発の検討 に関する研究	46
畠山勝義	
11. 肝移植後に発症するC型肝炎の活動性を予測する方法の確立 —Osteopontin Promoter SNPsの有用性—	48
藤原研司	
12. 肝移植後、C型肝炎再発に関与する因子に関する研究	51
前原喜彦	
13. C型肝炎への生体肝移植における抗ウイルス療法に関する研究	53
幕内雅敏	
14. C型肝炎ウイルス陽性例における肝移植後のウイルス量の変化に関する研究	56
真辺忠夫	
15. C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究	58
宮川眞一	

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

### Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

総括研究報告書

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

主任研究者 門田守人 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科 教授

研究要旨:本研究は、臨床比較試験により、本邦のC型肝炎患者に最も適した肝移植後免疫抑制法を明らかにすることを最終目的とする。まず、研究の第一段階として、本邦の主要移植施設のC型肝炎患者に対する肝移植時の免疫抑制法の詳細を調査し、分担研究施設をステロイド「有」と「無」の2群に分け肝炎再発を比較するパイロット・スタディ(エンドポイントは肝炎の再発)、2)本邦多施設の過去のC型肝炎移植例の集計・解析によりタクロリムスとシクロスポリンを比較する研究、の2つの研究を開始した。これらの2つの研究から得られたエビデンスに基づき移植肝へのC型肝炎の再発率、及び拒絶反応の発生率を主なエンドポイントとしたランダムイズド・オープンラベル多施設共同比較試験の内容を決定し施行する。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス性肝硬変は肝移植の適応のうち多くを占めるが、肝移植後に高率に肝炎の再発が起こること、長期の観察では有意に生存率が低下することが報告されている。移植後の肝炎再発には免疫抑制状態が関与すると考えられ、世界の多くの施設において標準的な免疫抑制法からの工夫が試みられている。なかでも、ステロイド使用の有無やカルシニューリン・インヒビターの種類によって肝炎再発を抑制する方法が研究されているが、まだ一定の結論が得られていない。本研究の目的は日本人のC型肝炎患者に最適の免疫抑制法を構築することであり、その成果は、本邦のC型肝炎患者の移植後の長期予後を改善すると

予測され、極めて有意義である。

B. 研究方法

1. 他施設共同研究として以下の研究を遂行する。

①分担研究施設をステロイド「有」と「無」の2群に分け移植後肝炎再発を比較する前向きのパイロット・スタディを行い、肝炎再発率を比較する(内科系の研究者によるウイルス学的検討も行う)。対象はC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変に対して生体肝移植を施行する18歳以上の成人患者で、本研究を理解し同意を文書で得られた患者とする。除外基準は(1)ABO不適合ドナーからの肝移植症例(2)再肝移植症例、(3)HIV抗体陽性症例、とする。主なエンドポイントは移植肝へのC型肝炎の再発率、及び拒

絶反応の発生率とする。

②本邦多施設の過去のC型肝炎移植例に対する調査を続行し、長期予後の観点から、タクロリムスとシクロスポリンとの間で肝炎再発に差があるかの結論を得る。これらの結果から、日本人のC型ウイルス性肝硬変の術後免疫抑制に関して、現時点で最も必要性が高く、かつ実現可能であり期間内に結論を導きうる臨床比較試験を策定する。

2. 策定したランダムイズド・オープンラベル多施設共同比較試験を行う(次年度以降)。

(倫理面への配慮)

研究に当たって倫理面に十分配慮し、各分担研究施設の倫理委員会(IRB)の認可を必要とする。

### C. 研究結果

研究方法1. -①「ステロイド「有」と「無」の2群に分け移植後肝炎再発を比較する前向きのパイロット・スタディ」に関しては、実施計画書を作成し、各分担研究施設でのIRB申請を指示した。3月10日現在、15施設中3施設でIRBの認可を受けており、4施設で審議中である。このうち、これまでに3例の症例登録があった。現在、症例登録(目標40例)および臨床データ解析中である。研究方法1. -②「本邦多施設の過去のC型肝炎移植例に対する調査」は現在データ解析中である。

### D. 考察

本研究の目的はC型肝炎硬変に最適の免疫抑制法にある。中でも、ステロイドを使用しない免疫抑制療法、あるいはカルシニューリン・インヒビターの工夫による免疫抑制療法が有力な候補である。ステロイドを使用しない免疫抑制療法は欧米でこれまでにいろいろな報告があり、安全に施行できることなどが示されているが、成人間生体肝移植における報告は皆無である。このことから、本研究ではまずステロイドを使用しない免疫抑制療法の安全性についてまず考察することとした。分担研究施設からは、ステロイドを使用しない免疫抑制療法をすでに試み、安全に施行できたとの報告もある。本研究ではステロイドを使用しない免疫抑制療法において、その安全性とC型肝炎再発との関連を調べる。この結果から、ランダムイズド・オープンラベル多施設共同比較試験を策定し、ステロイドを使用しない免疫抑制療法の有効性を研究する予定である。同時にカルシニューリン・インヒビターの工夫による最適な免疫抑制療法に関して研究中である。

### E. 結論

現在各分担施設においてステロイドを使用しない免疫抑制療法の前向きのパイロット・スタディを行っている。結果は現在症例集積および解析中であるが、この結果を基にランダムイズド・オープンラベル多施設共同比較試験を策定し、ステロ

イドを使用しない免疫抑制療法の有効性を研究する予定である。また同時にカルシニューリン・インヒビターの工夫による最適な免疫抑制療法に関して研究中である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 梅下浩司, 門田守人: 生体肝ドナーの術後合併症と予後—日本肝移植研究会のとりくみを中心に. 外科 66(9), 1019-1024, 2004.

##### 2. 学会発表

- 1) Hashimoto K., Dono K., Sakon M., Marubashi S., Nagano H., Umeshita K., Nakamori S., Monden M.: Serial change of liver volume and hemodynamics in liver grafts after living related liver transplantation. American Transplant Congress 2004. 5.5-5.19. (Boston, Massachusetts U.S.A.)
- 2) Marubashi S., Dono K., Sakon M., Gotoh K., Takahashi H., Hashimoto K., Kubota M., Yamamoto S., Miyamoto A., Nagano H., Nakamori S., Umeshita K., Monden M.: RISK FACTORS FOR GRAFT DYSFUNCTION AFTER ADULT-TO-ADULT LIVING

DONOR LIVER  
TRANSPLANTATION. ILTS (国際肝移植学会) 2004. 6.. (Kyoto)

- 3) Marubashi S., Dono K., Sakon M., Gotoh K., Takahashi H., Hashimoto K., Kubota M., Yamamoto S., Miyamoto A., Nagano H., Nakamori S., Umeshita K., Monden M.: RISK FACTORS FOR GRAFT DYSFUNCTION AFTER ADULT-TO-ADULT LIVING DONOR LIVER TRANSPLANTATION. America Transplant Congress 2004 2004. 6.. (Boston)
- 4) Marubashi S., Dono K., Sakon M., Gotoh K., Takahashi H., Hashimoto K., Kubota M., Yamamoto S., Miyamoto A., Nagano H., Nakamori S., Umeshita K., Monden M.: Living Donor Liver transplant with renoportal anastomosis for spontaneous splenorenal shunt. America Transplant Congress 2004 2004. 6.. (Boston)
- 5) 高橋秀典, 丸橋繁, 橋本和彦, 久保田勝, 宮本敦史, 永野浩昭, 堂野恵三, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 生体部分肝移植における肝静脈再建. 第104回日本外科学会定期学術集会 2004.

4.7-4.9. (大阪市)

- 6) 堂野恵三, 丸橋繁, 左近賢人, 山本慎治, 久保田勝, 橋本和彦, 後藤邦仁, 高橋秀典, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 門田守人: 成人肝移植における胆管再建術. 日本肝胆膵外科関連会議 第 16 回日本肝胆膵外科学会第 33 回日本胆道外科研究会第 31 回日本膵切研究会 2004. 5.13-5.14. (大阪市)
- 7) 堂野恵三, 丸橋繁, 左近賢人, 梅下浩司, 永野浩昭, 中森正二, 宮本敦史, 高橋秀典, 後藤邦仁, 橋本和彦, 久保田勝, 門田守人: 当科におけるウィルス性肝炎に対する肝移植後再発予防と成績. 第 22 回日本肝移植研究会 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 8) 高橋秀典, 堂野恵三, 橋本和彦, 久保田勝, 丸橋繁, 宮本敦史, 永野浩昭, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 右肝グラフトを用いた生体部分肝移植における静脈再建-静脈グラフトを用いた中肝脈分再建について-. 第 22 回日本肝移植研究会 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 9) 久保田勝, 堂野恵三, 橋本和彦, 丸橋繁, 宮本敦史, 永野浩昭, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 生体部分肝移植におけるドナー・レシipientの肝容積の推移. 第 22 回日本肝移植研究会 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 10) 山本慎治, 堂野恵三, 後藤邦仁, 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 丸橋繁, 宮本敦史, 永野浩昭, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 劇症肝炎に対する脳死肝臓移植の一例. 第 22 回日本肝移植研究会 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 11) 橋本和彦, 堂野恵三, 後藤邦仁, 高橋秀典, 久保田勝, 山本慎治, 丸橋繁, 宮本敦史, 永野浩昭, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 高シトルリン血症に対して自己肝温存生体肝移植 (APOLT) を施行した 1 例. 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 12) 堂野恵三, 丸橋繁, 左近賢人, 永野浩昭, 梅下浩司, 久保田勝, 山本慎治, 宮本敦史, 橋本和彦, 門田守人: 内頸静脈グラフトを用いた左腎静脈門脈吻合術による生体部分肝移植門脈再建法. 第 59 回日本消化器外科学会定期学術集会 2004. 7.21-7.23. (鹿児島市)
- 13) 久保田勝, 堂野恵三, 橋本和彦, 丸橋繁, 宮本敦史, 永野浩昭, 梅下浩司, 中森正二, 左近賢人, 門田守人: 生体肝移植ドナーの術前評価における DIC 併用

- CT-angiography. 第 59 回日本消化器外科学会定期学術集会 2004. 7.21-7.23. (鹿児島市)
- 14) 堂野恵三, 丸橋繁, 永野浩昭, 梅下浩司, 宮本敦史, 中森正二, 山本慎治, 門田守人: 肝移植後のC型肝炎の再発予防対策. 第 40 回日本移植学会総会 2004. 9.16-9.18. (岡山市)
- 15) 山本慎治, 堂野恵三, (星田義彦), 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 丸橋繁, 永野浩昭, 梅下浩司, 門田守人: 脳死肝臓移植後, T-cell Lymphoma を発症した 1 例. 第 40 回日本移植学会総会 2004. 9.16-9.18. (岡山市)
- 16) 濱直樹, 堂野恵三, 丸橋繁, 天野晃滋, 高橋秀典, 橋本和彦, 山本慎治, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 生体ドナーが存在したにもかかわらず肝移植前に死亡した 4 症例. 第 81 回日本消化器病学会近畿支部例会 2004. 9.11-9.11. (京都市)
- 17) 高橋秀典, 堂野恵三, 丸橋繁, 濱直樹, 天野晃滋, 橋本和彦, 山本慎治, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝予備能からみた生体肝移植の至適時期の検討. 第 81 回日本消化器病学会近畿支部例会 2004. 9.11-9.11. (京都市)
- 18) 丸橋繁, 堂野恵三, 門田守人: 肝細胞癌にたいする肝移植: 適応拡大と肝癌再発予測. 第 46 回日本消化器病学会大会 2004. 10.21-10.23. (福岡市)
- 19) 丸橋繁, 梅下浩司, 門田守人: 肝移植後ウィルス肝炎対策—全国アンケートより—. 第 46 回日本消化器病学会大会 2004. 10.21-10.23. (福岡市)
- 20) 丸橋繁, 堂野恵三, 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 山本慎治, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, (長谷川利路), (福澤正洋), 門田守人: 生体部分肝移植における血管・胆管合併症と長期予後. 第 104 回日本外科学会定期学術集会 2004. 4.7-4.9. (大阪市)
- 21) 丸橋繁, 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 和田浩志, 中村将人, 太田英夫, 山本為義, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌に対する肝移植適応基準. 第 40 回日本肝癌研究会 2004. 6.24-6.25. (つくば市)
- 22) 丸橋繁, 堂野恵三, 後藤邦仁, 高橋秀典, 橋本和彦, 久保田勝, 山本慎治, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田



- 守人: Simulect, Neoral を用いた生体肝移植術後ステロイドフリー免疫制御療法. 第22回日本肝移植研究会 2004. 7.1-7.2. (東京都)
- 23) 丸橋繁, 堂野恵三, 橋本和彦, 山本慎治, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌に対する生体肝移植における肝癌再発予測と末梢血中 AFPmRNA の意義. 第59回日本消化器外科学会定期学術集会 2004. 7.21-7.23. (鹿児島市)
- 24) 丸橋繁, 堂野恵三, 宮本敦史, 永野浩昭, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) を呈した生体部分肝移植の一例. 第40回日本移植学会総会 2004. 9.16-9.18. (岡山市)
- 25) 丸橋繁, 堂野恵三, 門田守人: 肝細胞癌に対する肝移植: 適応拡大と肝癌再発予測. 第8回日本肝臓学会大会 2004. 10.21-10.22. (福岡市)
- 26) 丸橋繁, 堂野恵三, 門田守人: 肝細胞癌にたいする肝移植: 適応拡大と肝癌再発予測. 第46回日本消化器病学会大会 2004. 10.21-10.23. (福岡市)
- 27) 丸橋繁, 梅下浩司, 門田守人: 肝移植後ウィルス肝炎対策-全国アンケートより-. 第46回日本消化器病学会大会 2004. 10.21-10.23. (福岡市)
- 28) 永野浩昭, 丸橋繁, 堂野恵三, 宮本敦史, 久保田勝, 橋本和彦, 高橋秀典, 後藤邦仁, 太田英夫, 中村将人, 和田浩志, 中森正二, 梅下浩司, 左近賢人, 門田守人: 肝細胞癌に対する生体肝移植の位置付けと今後の展望. 第40回日本肝臓学会 2004. 6.24-6.25. (つくば市)
- 29) 永野浩昭, 堂野恵三, 丸橋繁, 後藤邦仁, 高橋秀典, 宮本敦史, 中森正二, 梅下浩司, 門田守人: 成人間生体肝移植における肝動脈再建に関する報告. 第40回日本移植学会総会 2004. 9.16-9.18. (岡山市)
- 30) 永野浩昭, 堂野恵三, 門田守人: 成人生体部分肝移植症例・移植肝提供者に関する報告. 第8回日本肝臓学会大会 2004. 10.21-10.22. (福岡市)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究

分担研究報告書

C型肝炎への肝移植後の免疫療法に関する研究

分担研究者 浅原利正 広島大学病院 病院長

研究要旨: 肝移植後の免疫抑制療法プロトコールは臨床経験に基づくとこ  
ろが多く、免疫応答の客観的な指標に対応して調整されているわけではない。  
肝移植後におけるC型肝炎の再発予防には、必要最小限の免疫抑制  
療法を実施することが肝要であり、信頼性のある免疫監視法の確立が求めら  
れる。我々は、CFSE 細胞質染色法とマルチパラメーターフローサイトメリー  
を応用した MLR assay (以後、CFSE-MLR と略す)を臨床導入した。  
CFSE-MLR は拒絶診断や免疫抑制剤減量の指標として有用で、特に不  
必要な拒絶反応治療を回避できた。

#### A. 研究目的

C 型ウイルス(HCV)性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い疾患の一つである。しかし、拒絶反応の予防および治療目的で使用される免疫抑制剤がHCVの複製を増長し、HCV 肝炎の移植後再発が高率に起こる。免疫応答の客観的な指標に基づき、必要最小限の免疫抑制療法が実践できれば、肝移植後におけるHCV 肝炎の再発予防につながる可能性がある。我々は、CFSE 細胞質染色法とマルチパラメーターフローサイトメトリー(FCM)を応用した MLR assay (以後、CFSE-MLR と略す)を臨床導入し、免疫応答監視法としての有用性を検討した。

CFSE 色素は細胞障害性なく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性質を有し、反応性リンパ球の表面分子や活性化マーカーと同時に FCM を用いて解析できるた

め、反応性 T 細胞の precursor frequency、mitotic index や stimulation index の算出、定量化が可能である。我々は、放射性同位元素を用いない CFSE-MLR によって、CD4、CD8T 細胞別にアロ特異的反応性リンパ球応答を視覚的・定量的に測定する方法を確立したが、臨床肝移植における本免疫監視法の正当性および有効性について検討を行なった。

#### B. 研究方法

##### 対象

2002 年1月から 2004 年 12 月までに広島大学病院で生体部分肝移植術を施行した症例のうち 34 例を対象とした。そのうち、C 型肝炎合併例は 14 例であった。

### 免疫抑制剤・検討方法

肝移植後免疫抑制療法は、Tacrolimus (Prograf)、Cyclosporin (Neoral) および MMF (Cellcept) を使用し、トラフレベルを指標に漸減した。ステロイドの中止は、ウイルス性肝炎合併例は原則的に術後4週間以内、非合併例は2~3ヶ月とした。CFSE-MLR は、ステロイド中止前、あるいは、肝機能の異常を認め、臨床的に拒絶反応が疑われた際、肝生検とともに施行した。肝機能異常が高度に進行し、血行動態の異常など拒絶以外の原因が否定された場合、ステロイドのミニパルス療法 (125-250 mg/day of Methylprednisolone for 2-3 days) を行なった。CFSE-MLR で抗ドナー応答の亢進を認めない場合、さらなる拒絶治療を行わずそれまでの免疫抑制療法を維持した。これに対して、特異的な抗ドナー応答の亢進を認めた場合、肝機能が有意に改善していなければ Steroid-pulse 療法を再度施行した。さらにこれに抵抗性を示した場合で、抗ドナー反応性 CD25 陽性 CD8T 細胞の有意な増殖を認めた場合、速やかに OKT3 療法を追加した。

### CFSE-MLR

レシピエント、ドナー、またサードパーティとして健常人ボランティアから末梢血を採取し、単核球を分離後、放射線照射を施して Stimulator とした。また、同様に採取した術後レシピエントの単核球は

CFSE 色素でラベリングし、Responder とし、両者を5日間共培養したのち浮遊細胞を回収してフローサイトメトリーで解析後、CD4、CD8T 細胞各々の Stimulation Index を算出した。同時に、反応性 CD8T 細胞の CD25 (インターロイキン2レセプター) の表出率を測定した。

(倫理面への配慮)

C 型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究に対しては、広島大学医学部倫理委員会において承認 (通知番号第 379 号) 済みである。CFSE-MLR に関しては、インフォームドコンセントを得て実施した。

### C. 研究結果

対象症例 34 例 (C 型肝炎 14 例)のうち、術後1年以内に AST, ALT, ビリルビンの上昇など肝機能異常を認め、臨床で急性拒絶反応を疑った症例は 14 例 (C 型肝炎 6 例) であった。肝生検において急性拒絶反応の診断が得られたのは、11 例 (C 型肝炎 5 例) であった。CFSE-MLR において、抗ドナー応答の亢進を認めたのは、4 例 (C 型肝炎 3 例) であった。これらの症例はすべて抗ドナー反応性 CD8T 細胞の CD25 の表出率が 50% 以上を示した。しかしながら、CFSE-MLR で、抗ドナー応答の亢進を認めず、抗ドナー反応性 CD8T 細胞の CD25 の表出率が 50% 未満の症例は、前区域枝のうっ血、薬剤性肝障害、ウイル

ス性肝炎の再発、自己免疫性肝炎の再発が疑われた。とくに、C型肝炎再発症例においては、免疫抑制療法を減量することで、肝機能の改善を認める症例が少なくなかった。HCV ウイルス量との相関性は、CFSE-MLR で抗ドナー応答の亢進、および抗ドナー反応性 CD8T 細胞の CD25 の表出率が 50%以上を示した時は、比較的ウイルス量が低値であった。一方、抗ドナー応答の亢進を認めなかった場合、その後ウイルス量が上昇する傾向にあった。また、CFSE-MLR において、抗ドナー応答の亢進を認めなかったにも関わらず、肝生検で急性拒絶反応と診断し、臨床においても拒絶反応を強く疑った症例

においては、ステロイドパルスを施行することで患者の免疫状態が低下し、術後管理が困難となった症例を認めた。CFSE-MLR の結果を参考に、免疫抑制剤の投与量をコントロールすることで過剰な免疫抑制剤の投与を回避することができた。

#### D. 考察

臓器移植後には拒絶反応を抑えるため免疫抑制療法を行なうことが必須であるが、免疫抑制剤によって副作用を引き起こし、重篤な感染症や悪性新生物の発生を認めることも起こりえる。さらに、C型肝炎などウイルス性肝炎合併例では、ウイルスの増勢を助長する可能性が懸

念される。最近では、肝臓移植後の C 型肝炎の再発により早期に肝硬変に至り、グラフトの予後が非 C 型肝炎例と比較して長期の予後が有意に不良であるという報告が国内外よりある。また、HCV 陰性患者では術後急性拒絶反応は予後と関連しないのに対し、HCV 陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子である。なぜなら、拒絶反応の治療に強い免疫抑制薬を使用することで血中・肝内のウイルス量を増加させ、肝炎の進行を早めるためと理解される。HCV 陽性の移植患者では、術後の OKT3 やステロイドパルスによる拒絶治療が予後不良因子となる。したがって、急性拒絶反応と C 型肝炎再発、あるいはその他の原因との的確に鑑別し、必要最低限の免疫抑制療法を行なうために、個々の患者の免疫状態を把握することが重要となる。しかしながら、肝生検において C 型肝炎の再発と急性拒絶反応の組織学的な鑑別がしばしば困難であるとされている。

本研究においても、肝生検と CFSE-MLR の結果不一致例を再検討しても肝生検では、急性拒絶反応の所見を満たしており、組織診断は正当であったと考えられる。したがって、術後肝機能異常を認めた場合には、肝生検で肝臓内の病態を確認するとともに、CFSE-MLR を用い、免疫学的にドナーに対する反応性の有無を確認する必要

があると思われる。

#### E. 結論

CFSE-MLR は肝移植後の免疫監視法として良い指標となりうると思われた。とくに、フェノタイプ別で判定した場合、CD8+T 細胞に特異的抗ドナー反応を認め、CD25 の表出率が 50%以上である場合、急性拒絶反応を示唆する所見であると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, and Asahara T.: Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. Immunological Investigations. 2004 33(3), 309-324.
- 2) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, Mitsuta H, Tashiro H, Itamoto T, and Asahara T.: Low incidence of acute rejection after living donor liver transplantation Immunological analyses by MLR using a CFSE labeling technique. Transplantation. in press

##### 2. 学会発表

- 1) Tanaka Y, Ohdan H, Asahara T., The John B.: Hynes Convention Center Boston, MA USA, Clinical usefulness of the MLR assay using the CFSE-labeling technique to monitor the immunosuppressive state after living-donor liver transplantation, American Transplant Congress 2004, 2004.5.14-19
- 2) Tanaka Y, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T.: AUSTRIA Center, Vienna Austria, Unexpected low incidence of acute rejection after living donor liver transplantation: Immunological analyses by MLR using CFSE labeling technique, XX International Congress Of The Transplantation Society, 2004.9.5-10
- 3) Ohdan H, Tanaka Y, Onoe T, Tokita D, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T.: Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, Tailoring of Immunosuppression under Immune-Monitoring by Mixed Lymphocyte Reaction Assay using CFSE-Labeling Technique in Adult-to-Adult Living Donor Liver Transplantation., 19th World Congress of International Society for

- |  |              |
|--|--------------|
| Digestive Surgery, 2004.12.8-11  | なし           |
| 4) 田中友加, 大段秀樹, 田代裕尊, 満田裕, 尾上隆司, 時田大輔, 石山宏平, 井手健太郎, 志々田将幸, 周聞笛, 板本敏行, <u>浅原利正</u> . 京王プラザホテル(新宿区、東京都)、生体肝移植における CFSE ラベリング法を用いた MLR による免疫監視結果と病理診断との比較、第 22 回日本肝移植研究会、H16.7.1~7.2 | 3. その他<br>なし |
| 5) 大段秀樹, 田中友加, 尾上隆司, 時田大輔, 原秀孝, 井手健太郎, 志々田将幸, 田代裕尊, <u>浅原利正</u> . 鹿児島市民文化ホール(鹿児島市、鹿児島)、CFSE 細胞質染色法を応用した MLR による生体部分肝移植後免疫監視法の有用性、第 59 回日本消化器外科学会定期学術集会、H16.7.21-23               |              |
| 6) 田中友加, 大段秀樹, 尾上隆司, <u>浅原利正</u> . 岡山コンベンションセンター、アロ反応性 T 細胞増殖とサイトカイン産生能の関係を同時に測定しうる MLR 法の開発、第 40 回日本移植学会総会、H16.9.16-18(岡山市、岡山県)   |              |

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子解析を用いた肝移植後の再発性 C 型肝炎に対する治療効果予測の試み

分担研究者 市田隆文 順天堂大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルスの再感染により、肝移植後、20%前後は短期間に肝硬変に進展する例、術直後より HCVRNA の急激な増殖とともに胆汁うっ滞を来たす重症型肝炎もしくは fibrosing cholestatic hepatitis という病態を示し、予後不良の経過をたどる症例が最近増加してきた。HCV の肝移植後の再感染は避けられない事実であり、これらに対処する方法としては、術後の抗ウイルス療法しかないのが現実である。しかし、このインターフェロンは時として、肝移植後に拒絶反応を誘発することが知られており、すべての症例に応用することは困難である。そこで、的確に効果予測を行い、効果が期待される症例を選別して、的確な抗ウイルス療法を行うことが臨床的に求められている。

そこで、通常認める C 型慢性肝炎の遺伝子解析による治療効果予測を行うと NR 例の予測は 83%の確率で行われ、SVR 例の予測は 93%であった。このことは、拒絶反応を誘発するインターフェロン治療をよりの確に症例を選別しておこなえると考えられる。すなわち、NR が予測される症例には少量、長期間の抗ウイルス療法による線維化抑制を目指すことが、より QOL を多めめることとなる。勿論、SVR 予測例には 48 週間の継続投与の完遂が成果を挙げることとなる。今後、薬剤耐性の予測も合わせて、肝移植後の症例に応用したいと考える。

共同研究者：

順天堂大学医学部肝胆膵外科	川崎誠治
ジェイ・ジー・エス	窪田規一

A. 研究目的

C 型肝炎の多くは肝移植後、短期間に再感染し、多くは無症候性のキャリア状態になるが、20%前後は短期間に肝硬変へ進展し、再移植の必要性に迫られる。さらに、10%前後のレシピエントは C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖とともに、胆汁うっ滞をきたす、重症型肝炎や fibrosing cholestatic hepatitis の臨床像を呈し、予後不良の病態を呈することがある。

HCV の感染を防御困難な現状では、肝移植後の適切な時期に抗ウイルス療法を開始することが、術後再感染に対する唯一の方法である。しかしながら、多くの脳死肝移植の成績を検討すると、治療中の減量や、脱落が認められ、通常の C 型肝炎に対する成績からかなり隔たりがある。そこで、肝移植後の肝生検組織、あるいは血清の遺伝子マイクロアレイを検索し、抗ウイルス療法の効果の予測と、薬剤抵抗性を知ることが、治療前に成されれば、無駄な治療と拒絶反応の誘発を防ぐことが出来

ると考える。本研究は、その前段階として、肝移植とはことなる、通常内科診療で認められる、C 型肝炎の遺伝子解析を行い、効果予測が可能か否かを検討した。

B. 研究方法

1. 対象

2004 年 4 月より 2005 年 1 月の間に新潟大学歯学総合病院を受診され、インターフェロンとリバビリン併用療法 48 週間を受けた C 型肝炎 35 例を対象とした。

2. 方法

十分なインフォームドコンセントにより文書による同意を得た後、肝生検組織を既報 (Daiba A, et al. BBRC2004;315:1088) のように肝組織より RNA を抽出・増幅後、肝臓発現遺伝子から選択し機能別に分類した優位発現遺伝子を搭載した cDNA チップによる解析を行い、得られた発現で一ターを用いてプロファイリング解析と診断アルゴリズムによる治療効果予測を試みた。

### C. 研究結果

- NR 例と診断アルゴリズムで予測した 6 例中、臨床的に NR 例と診断されたのは 5 例であり、その正解率は 83.3%であった。
- SVR 例と診断アルゴリズムで予測された 29 例中、27 例が臨床的にも SVR 例とされ、その正解率は 93.1%であった。

NO.	治療効果	MD	IFN	効果予測
1	NR	113.00	IFN + RBV 48W	NR
2	NR	40.15	IFN + RBV 24W	NR
3	SR	26.66	PEG + RBV 48W	NR
4	NR	24.75	IFN + RBV 24W	NR
5	NR	14.27	IFN + RBV 24W	NR
6	NR	13.52	IFN + RBV 48W	NR
7	TR	10.84	IFN + RBV 24W	SR or TR
8	SR	7.09	IFN + RBV 24W	SR or TR
9	TR	7.03	IFN + RBV 24W	SR or TR
10	TR	6.63	IFN + RBV 24W	SR or TR
11	TR	6.10	IFN + RBV 24W	SR or TR
12	TR	4.22	IFN + RBV 24W	SR or TR
13	SR	4.12	PEG + RBV 24W	SR or TR
14	TR	4.07	IFN + RBV 24W	SR or TR
15	TR	2.89	IFN + RBV 24W	SR or TR
16	NR	2.77	IFN + RBV 24W	SR or TR
17	SR	2.59	IFN + RBV 24W	SR or TR
18	SR	2.11	PEG + RBV 48W	SR or TR
19	SR	2.09	IFN + RBV 24W	SR or TR
20	SR	2.05	PEG + RBV 24W	SR or TR
21	TR	1.64	IFN + RBV 24W	SR or TR
22	SR	1.49	IFN + RBV 24W	SR or TR
23	SR	1.39	PEG + RBV 48W	SR or TR
24	SR	1.34	PEG + RBV 24W	SR or TR
25	SR	1.33	PEG + RBV 24W	SR or TR
26	TR	1.20	IFN + RBV 24W	SR or TR
27	NR	1.12	IFN + RBV 24W	SR or TR
28	SR	0.72	IFN + RBV 24W	SR or TR
29	SR	0.60	PEG + RBV 24W	SR or TR
30	SR	0.52	PEG + RBV 24W	SR or TR
31	SR	0.48	IFN + RBV 24W	SR or TR
32	SR	0.38	PEG + RBV 24W	SR or TR
33	SR	0.29	PEG + RBV 48W	SR or TR
34	SR	0.24	IFN + RBV 24W	SR or TR
35	SR	0.16	IFN + RBV 48W	SR or TR

### D. 考察

通常の C 型慢性肝炎に対する、抗ウイルス療法としての標準治療であるインターフェロンとリバビリン併用 24 週あるいは 48 週間治療において、SVR は 50%前後、BR は 25%、NR25%とされている。この中で SVR 例以外は、肝移植後の病態で漫然と抗ウイルス療法を継続することにより、拒絶反応などの合併症を誘発する可能性が示唆されている。そこで、的確に抗ウイルス療法を施行する前に、効果を予測することは臨床的に重要なことと考える。今回は肝移植レシピエントに応用する前段階として、通常内科的に多く遭遇する C 型慢性肝炎を遺伝子解析で効果予測をすることは可能であった。今後、肝移植レシピエントに応用するとともに、さらに精度をあげて、薬剤耐性症例の見分け方も検討したいと思っている。

### E. 結論

肝生検組織を用いた遺伝子解析で抗ウイルス治療の効果予測が可能となった。今後は拒絶反応を誘発するインターフェロン治療を肝移植レシピエントに応用し、的確な治療効果を予測することを目指したい。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Sato Y, Watanabe H, Ichida T, Yamamoto S, Nakatsuka H, Oya H, Kameyama H, Watanabe T, Shimamura K, Abo T, and Hatakeyama K. Wall shear stress and intrahepatic leukocytes of graft in living related donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology*. 51(56):329-33, 2004.
- Takeishi T, Sato Y, Ichida T, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Watanabe T, and Hatakeyama K. Rapid progressive hepatitis C after liver transplantation: a case report. *Transplant Proc*. 36(8):2304, 2004.
- 山際訓, 市田隆文: インターフェロン抵抗性に関する宿主免疫関連因子. 肝胆膵 49(6):1039-1046, 2004.

#### 2. 学会発表



- 1) 山際訓, 市田隆文: C 型慢性肝炎の肝内リンパ球解析と遺伝子解析による治療効果予測. 2004 年 6 月 (舞浜) 日本肝臓学会総会シンポジウム. 肝炎ウイルスの病態と治療。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特に予定なし。
2. 実用新案登録  
特に予定なし。
3. その他  
特に予定なし。

厚生科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究  
分担研究報告書

C型肝炎への肝移植後の免疫抑制法に関する研究  
—免疫抑制剤早期転換による予防的抗ウイルス療法の導入—

分担研究者 兼松隆之 長崎大学大学院 移植・消化器外科 教授

研究要旨:C型肝炎に対する肝移植後抗ウイルス治療時に CyclosporinA に免疫抑制剤を変換し Interferon+Ribavirin 療法を行った。FK506 下で併用した症例と本法で施行した2例の比較では治療後のSVRには至っていないがウイルス量の増加なく肝機能も安定しており、抗ウイルス療法の安定化に寄与していると推察される。

共同研究者

蒲原行雄 長崎大学移植・消化器外科 助手  
川下雄丈 長崎大学移植・消化器外科 助手  
宮本俊吾 長崎大学移植・消化器外科 医員  
高槻光寿 長崎大学移植・消化器外科 医員

A. 研究目的

C型肝炎に対する肝移植後、ほぼ100%肝炎は再燃し、移植肝のグラフト生存に影響する。早期よりの抗ウイルス療法が唯一の予防策であるが移植直後の不安定な状況では拒絶との鑑別すら困難であり、免疫抑制と抗ウイルス療法の連携が重要である。そこで分担研究では通常免疫抑制から治療用免疫抑制にコンバートする方法を模索することを目的とした。特に強い免疫抑制力を有するFK506 と抗C型肝炎ウイルス作用が示唆される Cyclosporin A (CSA)の切り替えに着目する。

B. 研究方法

長崎大学にて生体肝移植を施行した平成14年から16年のC型肝炎硬変症例を研究対象とした。内訳はウイルス再燃による肝障害と考えられた症例3例の免疫抑制法・抗ウイルス療法・経過について検討した。

(倫理面への配慮)

全例、十分なインフォームドコンセントの後、肝移植症例として長崎大学倫理委員会(番号 09012153)に提出し受理された症例である。

C. 研究結果

年齢・性別は各々症例1;58 男性、症例2; 52 男性、症例3;50 女性であり、いずれも右葉グラフトを移植されていたウイルス 1b 型である。免疫抑制は全例FK506+ステロイドである。症例1は術後6ヶ月より肝機能障害とHCV-RNA の増加

(1log)を認め IFN $\alpha$  + Ribavirin で加療するも治療終了後肝機能は小範囲で変動しHCV-RNAは漸増傾向にある。症例2は術後2週目より黄疸と肝機能異常あり、生検より拒絶と診断しステロイドパルスを施行したが黄疸は増悪し再度の生検ではグリソン鞘の細胞浸潤は軽度だが肝細胞の脱落が相反して目立っていた。胆汁うっ滞型の肝炎を想定し免疫抑制をステロイドはそのままに FK506 を CsA に変更し Interferon  $\alpha$  2b (IFN)300 万単位と Ribavirin (Rib) 400 mg/day にて治療を開始した。黄疸は徐々に軽減し約1ヶ月にて t-bil 16.0mg/dl より 2.0mg/dl まで低下した。症例3は術後1ヶ月に AST, ALT 主体の肝機能障害を認め症例2と同様に IFN+Rib にて加療を行い、肝障害の改善を得た。症例2, 3とも血球減少による休薬および貧血改善のための輸血を要したが重篤な合併症は認めていない。以後6ヶ月治療を継続したが SVR には至らずウイルスは残存しているが増加なく肝機能異常はなく維持されている。

#### D. 考察

C 型肝炎再燃における免疫学的促進因子はステロイドや代謝拮抗薬の使用である。一方、抑制因子は抗ウイルス療法である。近年 CsA に HCV に対する抑制作用が報告されているが、移植直後の免疫抑制は拒絶との兼ね合いから手

慣れた方法が簡便である。そこで今回の検討では治療を必要とした時点で免疫抑制を FK506 から CsA に転換した症例を以前の FK506 継続症例と比較したが、移植後比較的早期でも安全に施行できることが確認された。長期的な SVR には至っていないが CsA 投与例ではウイルスの増加が見られていない。われわれの in vitro の検討では CsA は FK506 に比べ IFN シグナルの抑制が少ないという結果を得ておりより有効に IFN 治療がおこなわれたものと推測される。

#### E. 結論

HCV 感染症例における肝移植後ウイルス再燃時には免疫抑制薬を CsA に変更することは治療効果を安定させるために有用と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 高槻光寿, 大野康治, 蒲原行雄, 川下雄丈, 宮本俊吾, 古井純一郎, 兼松隆之: 小児生体肝移植における免疫抑制剤の減量・離脱 第104回日本外科学会定期学術集会、4.9. 2004. (大阪)

- 2) 高槻光寿, 蒲原行雄, 川下雄丈, 宮本俊吾, 伊藤雄一郎, 渡海大隆, 日高匡章, 曾山明彦, 永吉茂樹, 望月聡之, 兼松隆之:HCV 肝硬変に対する生体肝移植 長崎移植懇話会、10.8.2004.(長崎)
- 3) 宮本俊吾, 蒲原行雄, 川下雄丈, 高槻光寿, 伊藤雄一郎, 渡海大隆, 日高匡章, 曾山明彦, 永吉茂樹, 望月聡之, 兼松隆之:反復する局所再発肝癌を合併する肝硬変に対する肝移植 日本消化器病学会九州支部例会 7.18.2004.(久留米)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし